

Über die Verteilung
der Cholinesterase-Restaktivität
im menschlichen Serum
nach Inkubation mit DFP
bei einer Großfamilie

Karl Breu

1981

1981 № 4 10

AUS DEM INSTITUT FÜR RECHTSMEDIZIN
DER UNIVERSITÄT ERLANGEN-NÜRNBERG
DIREKTOR: PROFESSOR DR. H.-B. WUERMELING

UBER DIE VERTEILUNG DER CHOLINESTERASE-
-RESTAKTIVITÄT IM MENSCHLICHEN SERUM
NACH INKUBATION MIT DFP BEI EINER GROSSFAMILIE

INAUGURAL-DISSERTATION
ZUR ERLANGUNG DER DOKTORWÜRDE
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER FRIEDRICH-ALEXANDER-UNIVERSITÄT
ERLANGEN-NÜRNBERG

VORGELEGT VON

KARL BREU

AUS INGOLSTADT

Gedruckt mit Erlaubnis der Medizinischen Fakultät
der Universität Erlangen-Nürnberg



Dekan: Prof. Dr. V. Becker
Referent: Prof. Dr. Dr. M. Geldmacher-v.Mallinckrodt
Korreferent: Prof. Dr. H.-B. Wuermeling
Tag der mündlichen Prüfung: 05.10.1981

1. Einleitung
- 1.1. Organische Phosphorverbindungen
- 1.2. Diisopropylfluorophosphat
- 1.2.1. Verteilung im Gewebe und Ausscheidung
- 1.2.2. Intoxikation und Therapie
- 1.2.3. Verwendung als Medikament
- 1.3. Untersuchungen zur DFP-ase
- 1.4. Formale Genetik
- 1.5. Vererbung von Paraoxonase
2. Problemstellung
3. Eigene Untersuchungen
- 3.1. Methodik zur Messung der Serumcholinesterase-Aktivität und deren Restaktivität nach Inkubation mit DFP
- 3.1.1. Butyrylcholinjodid als Substrat der Serumcholinesterase
- 3.1.2. Gewinnung des Serums
- 3.1.3. Angewandtes Meßverfahren
- 3.1.4. Herstellung der geeigneten DFP-Giftlösung
- 3.1.5. Versuchsablauf
- 3.1.6. Berechnung der Serumcholinesterase-Restaktivität
- 3.2. Versuchsergebnisse
- 3.3. Bestimmung des Variationskoeffizienten der Restaktivität des Kontrollserums bei den einzelnen Versuchsabläufen
- 3.4. Untersuchungen zum Erbgang der DFP-ase
4. Diskussion und Zusammenfassung
5. Literaturverzeichnis

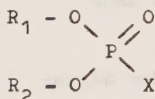
1. Einleitung

1.1. Organische Phosphorverbindungen

Die Entdeckung organischer Phosphorverbindungen reicht bis in die Mitte des vorigen Jahrhunderts zurück. Doch erst mit der Erkenntnis der toxischen Eigenschaften von Alkylestern der Fluorphosphorsäure durch LANG und VON KRÜGER im Jahre 1932 erhielten diese Substanzen wachsende Bedeutung.

Im Laufe einer Serie von Untersuchungen wurden die verschiedensten Phosphorverbindungen wie E 600, E 605, Tabun, Soman, Sarin usw. entdeckt.

All diesen Verbindungen ist folgende Strukturformel gemeinsam:



Allgemeine Formel der Organophosphatverbindungen nach SCHRADER (1954)

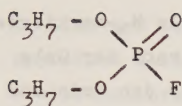
wobei für R_1 und R_2 vorwiegend der Methyl-, Äthyl- und Isopropylrest in Frage kommt. An Stelle des Radikals X kann F^- , CN, eine Aryl- oder eine Pyrophosphatgruppe treten.

Der bekannteste Vertreter dieser Stoffklasse wurde auf Grund seiner hervorragenden insektiziden Eigenschaften E 605 = Parathion = O,O - Diäthyl - O - (p-nitrophenyl) thiophosphat.

1.2. Diisopropylfluorophosphat (DFP)

1.2.1. Verteilung im Gewebe und Ausscheidung

Bereits 1946 synthetisierten MC COMBIE und SOUNDERS Diisopropylfluorophosphat (DFP), eine Verbindung, in der R_1 und R_2 durch Isopropylgruppen und X durch ein F^- ersetzt sind.



Strukturformel von DFP

JANDORF und MC NAMARA führten 1950 mit markiertem DFP, dem DFP^{32} , Verteilungsstudien am Meerschweinchen durch und entdeckten nach einer intravenösen Injektion von DFP^{32} , daß DFP in allen Geweben aufgenommen, jedoch nur in Lunge, Leber und Niere angereichert wird. Dabei nahm der Anteil des protein-gebundenen P^{32} an der gesamten Reaktivität mit der Verweildauer zu. Nach 24 Stunden wurde in den Geweben kein freies, nicht proteingebundenes DFP mehr gefunden, wobei der Gesamtgehalt an DFP^{32} in den Geweben, bis auf die Niere, wo er stark abnahm, nahezu konstant blieb.

1954 gelang es COHEN und WARRINGA mittels DFP^{32} , das sie in einer nicht-toxischen Dosis beim Menschen intramuskulär injizierten, zu zeigen, daß die DFP^{32} -Konzentration im Blut innerhalb weniger Minuten nach der Injektion stieg, nach 90 Minuten ein Maximum erreichte, dann jedoch wieder rasch sank. Über einen Beobachtungszeitraum von 27 Tagen ließ sich nur noch eine geringe Menge DFP^{32} nachweisen. P^{32} lag ausschließlich in Form von DIP (Diisopropylphosphat), an Plasmaproteine und Erythrozyten gebunden, vor. KURTH (1961), NOVOTNY (1970) und BENDTZEN (1977) wiesen die Bindung von DFP^{32} auch an Leukozyten und Lymphozyten nach.

COHEN und WARRINGA (1954) fanden, daß innerhalb der ersten 24 Stunden 33 % des P^{32} über den Urin ausgeschieden wird, ein weiteres Drittel in den darauffolgenden 9 Tagen. Der Anteil, des im gleichen Zeitraum ausgeschiedenen Phosphors im Stuhl beträgt lediglich 5 % der applizierten Menge.

HANSEN et al (1968 b) wiesen mittels H_3 -markiertem DFP nach, daß das DFP unmittelbar nach der Gabe unverändert in geringem Umfang über den Urin und über die Lunge ausgeschieden wird.

Aus diesen Untersuchungen schlossen COHEN und WARRINGA (1954), daß alles DFP im menschlichen Organismus, das nicht bereits im Blut an Blutkörperchen und Plasmaproteine gebunden wird, auf Grund seiner ausgeprägten Affinität zu den verschiedensten Proteinen rasch in den Geweben absorbiert wird. Dort wird DFP einer enzymatischen Hydrolyse durch eine DFP-ase unterzogen. DIP, das bei der Hydrolyse anfällt, wird im Gewebe weder gespeichert noch weiter metabolisiert, sondern sofort über Urin und Galle ausgeschieden. Die Bindung des DFP an andere Proteine außer der DFP-ase ist irreversibel und wird erst durch Proteinolyse gelöst.

HANSEN ermittelte 1968, daß sich DFP bei intravenösen Gaben kleiner Mengen (0,1 mg/kg) hauptsächlich in der Lunge anreichert, bei höherer Dosis (3-6 mg/kg) in Niere und Leber, wobei nach längerem Meßverlauf die DFP-Konzentration der Niere durch Ausscheidung im Urin stark abnimmt, während sie in der Leber nahezu unverändert hoch bleibt.

1.2.2. Intoxikationen

Kurz nach der ersten Synthese durch MC COMBIE und SOUNDERS (1946) erkannten diese den anticholinergen Charakter des DFP und führten darauf die extreme Toxizität zurück. MAZUR (1946) fand bei Bestimmungen der Cholinesteraseaktivität im Serum, in den Erythrozyten und im Gehirn von Kaninchen und Affen nach DFP-Gaben stark erniedrigte Werte und führte die auftretenden Vergiftungserscheinungen auf eine Hemmung der Acetylcholinesterase (E.C. 3.1.1.7) und den damit verbundenen raschen Anstieg des Acetylcholinspiegels

im Blut und Gewebe zurück. Es treten dadurch die typischen klinischen Symptome einer sog. endogenen Acetylcholinvergiftung auf:

Muskelschwäche, fibrilläre Zuckungen, tonisch-klonische Krämpfe infolge Acetylcholinanreicherung an der motorischen Endplatte, Bradykardie, Miosis, Schweißausbruch, Tränenfluß, Erbrechen, Durchfall, Lungenödem infolge Acetylcholinanreicherung an den postganglionären cholinergen Nervenendigungen der glatten Muskulatur; außerdem zentralnervös bedingt - Angst, Kopfschmerzen, Krämpfe und Koma.

Aber besonders bei hochdosierter DFP-Gabe, wie sie unter dem Schutz von Toxogonin ^(R) und Atropin möglich ist, oder bei Untersuchungen an isolierten Organen können Phänomene auftreten, die nicht allein auf einen Anstieg des Acetylcholins zurückzuführen sind.

So vergiftete NAESS (1956) isolierte Organe mit hohen Dosen DFP und bemerkte, daß über indirekte Stimulation keine Muskelkontraktionen mehr auslösbar waren. Da diese Blockade mit Acetylcholin allein nicht zu reproduzieren war, und durch Auswaschen von eventuell freiem DFP diese Blockade aufgehoben werden konnte, ohne daß die Cholinesterase-Aktivität stieg, führte NAESS diese Blockade auf eine reversible Bindung des freien DFPs an Rezeptoren zurück.

Eine ähnliche Bindung von DFP und eine daraus resultierende nicotinähnliche Wirkung hat VERBEKE (1948/49) an den intracardialen Synapsen des nervus vagus, den parasympathischen Ganglien der Bronchien, des Gastrointestinaltraktes und der Blase gefunden. Neben diesen stimulierenden Wirkungen kann es aber auch bei entsprechend hohen DFP-Konzentrationen (80-150 mg/kg am Hundeherzen) zu einer reversiblen Blockade des nervus vagus kommen.

JOHNSON (1970) beobachtete an Hennen 10-14 Tage nach DFP-Intoxikation eine ausgeprägte Ataxie und RUSSEL (1971) stellte an Ratten Veränderungen der Ess- und Trinkgewohnheiten fest.

Beim Menschen zeigte sich erwartungsgemäß bei chronischen Intoxikationen auch der muscarin- und nicotinartige Effekt cholinergischer Drogen, wobei die Gastrointestinalen Beschwerden im Vordergrund stehen.

Dabei ergaben sich außer der erniedrigten Cholinesterasekonzentration keine pathologischen Veränderungen der klinisch-chemischen Parameter. Die Reizleitung im EKG wurde nicht beeinflusst (GROB 1947 b).

Auffallender Weise traten jedoch sehr früh Symptome seitens des Zentralen Nervensystems auf: Verwirrtheit, exzessives Träumen, Schlaflosigkeit, motorische Unruhe, Tremor, Spastik, Alpträume, vermehrte Libido, Schwindel, Parästhesien, visuelle Halluzinationen und Neuralgien. Dabei kommt es zu EEG-Veränderungen, die schon nach 2-7 tägiger DFP-Einnahme einsetzen, jedoch erst 7 Wochen nach Absetzen der Therapie verschwinden (GROB 1947 a).

Bei accidentellen DFP-Intoxikationen treten nach 15 Minuten bis 3 1/2 Stunden nach Kontamination Augenstechen, Sehstörungen und Doppelbilder auf. Ihnen folgen kolikartige Leibschmerzen, Diarrhoe, Muskelschwäche und spastisch bedingte Atemnot, die in Bewußtlosigkeit, Zyanose, Zeichen eines Lungenödems und erhöhten Muskeltonus übergehen (SEDAN 1952, ERDMANN 1960, SCHLAAK 1966, MOORE 1956).

Als Therapie der Wahl empfahl RUMP (1975) Atropin, Toxogonin[®] (Obidoxim-hydrochlorid), Valium (Diazepam) und CTMB (Natrium-3-chloro-2, 5, 6 -Trimethylbenzoat).

1.2.3. Verwendung als Medikament

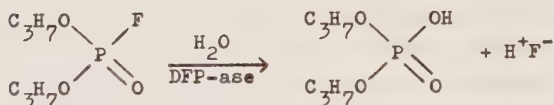
OUILUAM sagte 1947 dem DFP eine große therapeutische Zukunft als Medikament bei Myasthenia Gravis, Glaukom, Blasen und Darmatonien voraus, und stellte es auf eine Stufe mit den Sulfonamiden und dem Penicillin. Dieser Optimismus mußte inzwischen einer tiefen Skepsis weichen. Bei der Therapie der Myasthenie mußte DFP aufgrund seiner Nebenwirkungen dem Neostigmin weichen. Empfohlen wird DFP, das unter den Namen Fluostigmin, Diflupil und Floropryl auf dem Markt ist, nur noch bei Strabismus convergens - GELLMANN (1973) - oder aber als Mittel zweiter Wahl bei therapieresistentem Glaukom (FORTH 1975).

1.3. Untersuchungen zur DFP-ase

MAZUR und BODANSKI fanden bereits 1946, daß sowohl im Plasma als auch in den Geweben von Kaninchen der Abbau von Dialkylfluorophosphatverbindungen nicht auf den katalytischen Effekten anorganischer Verbindungen beruht, sondern daß die Hydrolyse der Phosphor-Fluor-Bindung hier enzymatischen Ursprungs ist. Aufgrund von vorhandener Thermolabilität sowie fehlender Dialysierbarkeit und Empfindlichkeit gegenüber typischen Enzym-inhibitoren schloß MAZUR (1946), daß es sich hierbei um ein Enzym handle.

MOUNTER (1954) untersuchte später die Hydrolyse von DFP, TEPP (Tetraaethylpyrophosphat), Paraoxon (E 600) und p-Nitrophenylacetat im Kaninchenserum. Ein gleiches Maß an Hitzeempfindlichkeit der enzymatischen Hydrolyse bei allen vier Substraten, die identische Blockierbarkeit ihrer Hydrolyse durch Schwermetallionen und die Tatsache, daß bei Substratgemischen eine kompetitive Hemmung beobachtet wurde, wiesen darauf hin, daß ein einziges Enzym für die Hydrolyse der vier Substrate verantwortlich ist.

Außerdem konnten MOUNTER und DIEN (1954) zeigen, daß bei der enzymatischen Hydrolyse von verschiedenen Dialkylfluorophosphatverbindungen durch gereinigte Schweinenieren-DFP-ase pro Mol Substrat 1 Mol Fluorwasserstoffsäure und 1 Mol Dialkylphosphorsäure freigesetzt wird. Dabei wurde folgende Reaktionsgleichung für die Hydrolyse von DFP durch DFP-ase aufgestellt:



Bei Arbeiten über das Hämolsin in den Sendai- und New Castle Disease (NCD) Viren fand NEURATH (1965) ein Enzym, das die DFP-Hydrolyse enzymatisch beschleunigte. Er entdeckte ferner eine deutliche Korrelation zwischen der hämolytischen und DFP-spaltenden Aktivität, eine Beschleunigung der Wärmeinaktivierung und ihrer Hemmbarkeit durch Photooxidation. Deshalb schloß er, daß für das Sendai- und NCD-Virus Hämolsin und DFP-ase identisch sind.

ALDRIGE (1953 a) untersuchte Serumesterasen bei Kaninchen, Ratten und Pferden und fand dabei zwei Typen von Esterasen, die er hinsichtlich ihrer Hemmbarkeit durch E-600 in A-Esterasen, die durch E-600 nicht gehemmt werden, und B-Esterasen einteilte. Das Vorkommen von A-Esterasen konnte er bei zehn verschiedenen Tierarten und beim Menschen nachweisen. Wenig später fand ALDRIGE (1953 b) ein E-600 hydrolysierendes Enzym, genannt E-600 Esterase, wobei er durch verschiedene Experimente bezüglich der Eigenschaften dieses Enzyms feststellte, daß es identisch ist mit der schon bekannten A-Esterase.

MOUNTER (1956) schloß aufgrund dieser Untersuchungen und seiner eigenen Versuchsergebnisse, daß DFP, TEPP, Paraoxon und p-Nitrophenylacetat von einem einzigen Enzym hydrolysiert werden, daß es sich bei der DFP-ase des Kaninchenserums um eine A-Esterase handelt.

Obwohl es sich bei der DFP-ase des Kaninchenserums eindeutig um eine A-Esterase handelt, kann daraus nicht gefolgert werden, alle DFP-asen seien auch Esterasen und umgekehrt. Es gibt durchaus auch DFP-asen, wie z.B. das von MOUNTER gereinigte Enzympräparat aus Schweinenierenhomogenat, die nicht in der Lage sind Paraoxon zu spalten, und bei weitem sind nicht all die Enzyme, die wegen ihrer Fähigkeit, Paraoxon zu hydrolysieren, als A-Esterasen klassifiziert werden, auch DFP-asen.

Die einzige bekannte Arbeit über das Vorkommen der DFP-ase im Serum des Menschen stammt von MAZUR (1946), der H^+ -Ionen und F^- -Ionen als Spaltprodukte einer DFP-Hydrolyse nachwies. Es zeigte sich, daß menschliches Serum DFP-ase enthält, jedoch in einer Aktivität, die nur 10 % derjenigen beträgt, die für das Kaninchenserum bestimmt wurde.

1.4. Formale Genetik

Bereits im 18. Jahrhundert wurden viele Kreuzungsversuche und variationsstatistische Untersuchungen an Tieren und Pflanzen durchgeführt. In entsprechenden Experimenten untersuchte GEORG MENDEL (1822-1884) exakt den Erbgang einzelner Merkmale und gelangte so zu der entscheidenden Entdeckung konstanter Zahlenverhältnisse der Merkmale (1865). Die Bedeutung der Mendelschen Gesetze wurde jedoch zunächst nicht erkannt, bis sie 1900 von CORRENS, TSCHERMAK und DE VRIES wiederentdeckt wurden. 1902 zeigte GARROD als erster die Gültigkeit der Mendelschen Gesetze beim Menschen und übertrug den von MENDEL geprägten Begriff des rezessiven Erbganges auf seine Beobachtungen. FARABEE beschrieb 1905 zum ersten Mal den dominanten Erbgang beim Menschen am Beispiel der Brachydaktylie. Die klinische Genetik begann jedoch erst 1908 mit dem Werk von GARROD "Inborn Errors of Metabolism".

Als dominant wird ein Gen bezeichnet, wenn es im Zustand der Heterozygotie stets über sein Allel überwiegt und dadurch für die Ausprägung eines Merkmals allein maßgebend ist. So ist von den Allelen des ABO-Genlocus das Allel mit der Information für die Blutgruppe A dominant über das Allel für die Blutgruppe O. Ein Heterozygoter mit dem Genotyp AO wird den Phänotyp A zeigen. Schematisch ist der Weg eines dominanten Gens durch die verschiedenen Generationen in Abb. 1 dargestellt:

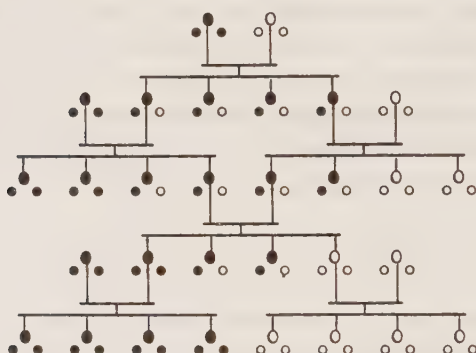


Abb. 1) Schema der dominant autosomalen Vererbung

○ oder ● = Phänotyp

○ oder ● = die beiden allele Gene des
betreffenden Genlocus

Beim dominant autosomalen Erbgang ist jeder heterozygote Genträger auch Merkmalsträger. Das merkmalstragende Gen wird folglich statistisch von jedem Genträger an die Hälfte seiner Nachkommen weitergegeben. Es besteht keine Bevorzugung eines bestimmten Geschlechts.

Anders verhält es sich bei der rezessiv autosomalen Vererbung. Rezessiv ist ein Gen dann, wenn es nur im homozygoten,

nicht aber im heterozygoten Zustand in Erscheinung tritt. So wird beim ABO-Genlocus das Allel für die Blutgruppe O von den Allelen A oder B überdeckt, der Phänotyp der Blutgruppe ist A oder B. Nur beim homozygoten Genotyp oo zeigt sich als Phänotyp die Blutgruppe O. Schematisch sind die verschiedenen Möglichkeiten des autosomal rezessiven Erbganges in Abb. 2 dargestellt:

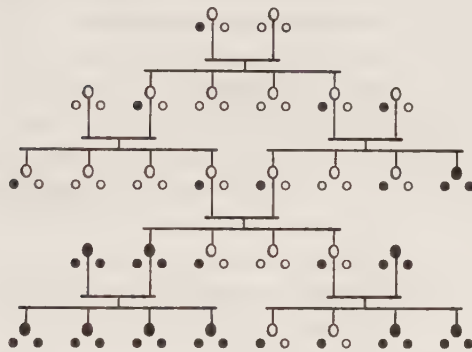


Abb. 2) Schema des autosomal rezessiven Erbganges

Beim rezessiv autosomalen Erbgang tragen nur ein Viertel der Kinder heterozygoter Eltern das Merkmal. Von drei phänotypisch nicht merkmals tragenden Kindern heterozygoter Eltern sind selbst zwei wieder heterozygot. Auch hier wird kein Geschlecht bevorzugt.

Eine geschlechtsgebundene Vererbung liegt immer dann vor, wenn die Gene, die das Merkmal verursachen, auf dem X-Chromosom liegen (für das Y-Chromosom sind bisher keine Gene bekannt). Beispiele hierfür sind die rezessiv X-chromosomal und dominant X-chromosomal vererbten Gene.

Produzieren gleichwertige allele Gene Merkmale, die, determiniert von unterschiedlichen Allelen eines Locus, sich nebeneinander in einem Individuum ausprägen, so spricht man von Kodominanz. Kreuzt man Eltern, von denen der eine Teil die Blutgruppeneigenschaft A, der andere die Blutgruppeneigenschaft B homozygot trägt, so wird die Nachkommenschaft, wie die Aufspaltungszahlen für diesen kodominanten Erbgang zeigen, die Blutgruppe AB aufweisen.

ABO-Blutgruppen

$$\begin{array}{ll}
 P : & AA \times BB \\
 F_1 : & 4 \text{ AB} \qquad \qquad AB \times AB \\
 F_2 : & \qquad \qquad AA : 2 \text{ AB} : BB
 \end{array}$$

Abb. 3) Aufspaltungszahlen für einen kodominanten Erbgang.

Weist der Phänotyp eines Heterozygoten Züge sowohl des einen wie des anderen entsprechenden Homozygoten auf, ohne mit einem von beiden jedoch übereinzustimmen, so spricht man von einem intermediären Erbgang. Kreuzt man z.B. homozygot rot mit weißblütigen Rassen der Wunderblume *Mirabilis jalapa*, so erhält man Heterozygote mit blaßrosa Blüten. Beim Menschen müßte man die meisten monogen bedingten Merkmale als intermediär bezeichnen.

Neben der Reinerbigkeit und der Heterogenie muß schließlich noch die Erscheinung der Polygenie beobachtet werden. Bei dem bisher betrachteten handelte es sich immer um monogen bedingte Merkmale, d.h. ein

einzigster Locus determiniert das jeweilige Merkmal. Diese Monogenie stellt jedoch nur ein Extrem einer Skala von Möglichkeiten dar, an dem sich Erbgänge besonders leicht verfolgen lassen. Der größte Teil der normalen und abnormalen Eigenschaften des Menschen steht aber unter dem Einfluß mehrerer Gene. Man spricht von multifaktorieller Vererbung. Das Konzept der multifaktoriellen oder polygenen Vererbung ist statistisch und bezieht sich auf die Verteilung meßbarer Merkmale in einer Population. Dennoch muß betont werden, daß hier keine Sonderform der Vererbung vorliegt. Die einzelnen Merkmale folgen den Mendelschen Gesetzmäßigkeiten. Sie können nur nicht einzeln in ihrer Wirkung verfolgt werden.

1.5. Untersuchung über die Vererbung von Paraoxonase, Arylesterase (EC 3.1.1.2)

Nachdem 1968 SKRINJARIK-SPOLJAR und REINER, sowie KRISCH unabhängig voneinander nachweisen konnten, daß E-600 auch durch menschliches Serum gespalten werden kann, konnte KRISCH bei Untersuchungen von je 25 Frauen und Männern zwei sich überlappende Gruppen erkennen, die sich durch die Höhe der Esteraseaktivität unterscheiden.

1969 inkubierten GELDMACHER - v. MALLINCKRODT, RABAST und LINDORF, sowie GELDMACHER - v. MALLINCKRODT und LINDORF Serumcholinesterasen von 75 verschiedenen Seren mit E-600 in $3,2 \times 10^{-8}$ molarer Konzentration und fanden, unabhängig von der Ausgangsaktivität, drei Gruppen mit niedriger, mittlerer und hoher Cholinesteraserestaktivität. GELDMACHER - v. MALLINCKRODT und LINDORF vermuteten einen Polymorphismus einer Aktivität, die E-600 spaltet. Daß tatsächlich ein Polymorphismus der Paraoxonaseaktivität für die drei gefundenen Gruppen unterschiedlicher Vergiftbarkeit der Serumcholinesterase mit E-600 ursächlich ist, konnten GELDMACHER - v. MALLINCKRODT, BAUMGARTNER, PÉTÉNYI, BULGIS, LINDORF und METZNER (1972) belegen. Nachdem durch weitere Untersuchungen durch GELDMACHER - v. MALLINCKRODT et al (1973 a) die Spezifität der menschlichen Serum-Paraoxonase nachgewiesen war wurden Untersuchungen über die Genetik dieses Enzyms eingeleitet.

Ein gewisser Widerspruch bestand jedoch darin, daß die bimodale Verteilung von KRISCH auf einen dominant-rezessiven Erbgang hinwies, während die trimodale Verteilung von GELDMACHER - v. MALLINCKRODT et al (1973 b) auf ein intermediäres Prinzip der Vererbung schließen ließ.

Es wurden 35 Familien mit insgesamt 52 Kindern mit der Anti-ChE-Technik untersucht. Die Ergebnisse ließen sich alle durch ein einfaches 2-Allele-System deuten, deshalb wählten GELDMACHER - v. MALLINCKRODT et al (1973) zur einfacheren Darstellung ihrer Ergebnisse folgende Bezeichnungen, wobei als Gruppengrenze zwischen Gruppe I und II eine Restaktivität von 11,2 %, zwischen II und III von 39 % angenommen wurde.

Tabelle 1

Gewählte Bezeichnungen für die Paraoxonasevererbung nach GELDMACHER - v. MALLINCKRODT, LINDORF, PETENYJ, FLÜGEL, FISCHER und HILLER (1973 b)

Serumcholinesterase-Restaktivität (Anti-ChE-Technik)	Serum Paraoxonase-Aktivität	Paraoxonasetyp	
		früherer Name	neuer Name (Genkombination)
niedrig	niedrig	Gruppe I	1 - 1
mittel	mittel	Gruppe II	2 - 1
hoch	hoch	Gruppe III	2 - 2

Die Namen der drei Gruppen leiten sich von der Annahme ab, daß es sich um ein intermediäres Vererbungsprinzip handelt. Demnach liegen der unterschiedlichen Paraoxonase-Aktivität zwei genetisch gleichwertige Gene zugrunde:

Ein Gen für niedrige Paraoxonase-Aktivität "1"

Ein Gen für hohe Paraoxonase-Aktivität "2"

Durch Kombination der beiden Allele ergeben sich die Paarungsmöglichkeiten

"1-1", "2-1" und "2-2".

Die Ergebnisse der Familienuntersuchung sind in Tabelle 2 wiedergegeben.

Tabelle 2

Serum-Paraoxonasetypen bei 35 Familien mit 52 Kindern (Ant-ChE-Technik) nach GELDMACHER - v. MALLINCKRODT, LINDORF, PÉTENYJ, FISCHER und HILLER (1973 b)

Eltern		Kinder		
Paarungen	Familien	Typ		
		1-1	2-1	2-2
	n	n	n	n
1-1 x 1-1	12	13	-	-
1-1 x 2-1	11	9	8	-
1-1 x 2-2	2	-	3	-
2-1 x 2-1	4	3	3	1
2-1 x 2-2	4	-	5	4
2-2 x 2-2	2	-	-	3
	35	25	19	8

Sie widersprechen in keinem Fall dem angenommenen Modell und machen es wahrscheinlich, daß der Polymorphismus der menschlichen Serum-Paraoxonase genetisch determiniert ist. Untersuchungen von DUMBACH (1977) und MÜLLER (1975) bestätigen die von GELDMACHER - v. MALLINCKRODT et al gefundenen Ergebnisse, die erweitert zusammengefasst bei GELDMACHER - v. MALLINCKRODT, HOMMEL und DUMBACH (1979) dargestellt sind.

2. Problemstellung

Nachdem GELDMACHER - v. MALLINCKRODT, LINDORF, PÉTÉNYI, FISCHER und HILLER (1973 b) durch ihre Untersuchungen von 35 Familien mit 52 Kindern ein intermediäres Prinzip der Vererbung (einfaches 2-Allele-System) der Paraoxonase feststellten und dieses Ergebnis durch weitere Untersuchungen von GELDMACHER - v. MALLINCKRODT, HOMMEL und DUMBACH (1979) bestätigt wurde, führte AHNERT (1981) orientierende Untersuchungen über einen Polymorphismus einer eventuellen menschlichen Serum-DFP-ase durch.

Obwohl diese Arbeit keinen Polymorphismus, sondern vielmehr eine unimodale Verteilung der Cholinesterase-Restaktivität erkennen ließ, führte ich zur Sicherung dieser Befunde weitere Untersuchungen über die Genetik der möglichen menschlichen Serum-DFP-ase an einer Großfamilie durch.

Dabei würde ein dominant-rezessiver Erbgang bedeuten, daß es hypothetisch ein dominantes Gen für hohe DFP-ase-Aktivität, das wir mit "H" bezeichnen, und ein rezessives Gen für niedrige DFP-ase-Aktivität "n" gäbe.

Es würden dann zwei Gruppen vorliegen:

- | | |
|-------------------------------|-------|
| 1) hohe DFP-ase-Aktivität | a) HH |
| | b) Hn |
| 2) niedrige DFP-ase-Aktivität | nn |

Einem intermediären Erbgang der DFP-ase-Aktivität würden zwei gleichwertige Gene zugrunde liegen:

- | | |
|-------------------------------|-----|
| 1) hohe DFP-ase-Aktivität | "2" |
| 2) niedrige DFP-ase-Aktivität | "1" |

Daraus würden dann, ähnlich der Einteilung von GELDMACHER - v. MALLINCKRODT et al (siehe Seite 15) für die Paraoxonaseaktivität drei Gruppen mit niedriger (1-1), mittlerer (2-1) und hoher (2-2) DFP-ase-Aktivität folgen.

Ich untersuchte deshalb die Seren von 28 Personen einer Großfamilie mittels der Anti-ChE-Technik und prüfte, ob sich Anhaltspunkte für eine Erblichkeit der gemessenen Cholinesterase-Restaktivität und damit für die Wirkung einer genetisch gesteuerten Serum-DFP-ase finden ließen, ähnlich wie dies für Paraoxon der Fall war.

3. Eigene Untersuchungen

3.1. Methodik zur Messung der Serumcholinesterase-Aktivität und deren Restaktivität nach Inkubation mit DFP in der Warburg-Apparatur (Anti-ChE-Technik).

3.1.1. Bei den Untersuchungen diente Butyrylcholinjodid (BCJ) als Substrat der Serumcholinesterase. Dies ist ein spezifisches Substrat, das einen schnelleren Abbau als Acetylcholin durch die Serumcholinesterase erfährt (WHITTAKER 1968).

Vergleichende Untersuchungen von LINDORF (1971) zwischen Acetylcholin und Butyrylcholinjodid als Substrat der Serumcholinesterase zeigten zwei Vorteile des Butyrylcholinjodids auf:

- Erstens beträgt die CO_2 -Entwicklung in der Warburg-Apparatur mehr als das Doppelte, verglichen mit der Verwendung von Acetylcholin, was den Meßvorgang bei bleibender Genauigkeit auf die Hälfte der Zeit verkürzt.
- Zweitens reagiert die Erythrocyten-Acetylcholinesterase nicht mit Butyrylcholinjodid, so daß in einem hämolytisch gewordenen Serum keine Störung der Messung der Ausgangs- und Restaktivität der Serumcholinesterase auftreten kann.

3.1.2. Gewinnung des Serums

Den Probanden wurden mit Serummonovetten mit "Separation Aid" der Firma Sarstedt (Nümbrecht)

10 ml Venenblut entnommen und dieses wurde möglichst rasch (Aufbewahrung höchstens 24 Stunden bei 4° C) nach Entnahme bei 1600 U/min 15 Minuten lang zentrifugiert, wobei sich in keinem Fall eine Hämolyse zeigte.

Das gewonnene Serum wurde entweder

- 1) sofort bearbeitet
oder
- 2) im Kühlschrank bei 4° C nicht länger als 3 Tage bis zur Versuchsdurchführung aufbewahrt
oder
- 3) sofort in der Tiefkühltruhe bei - 21° C eingefroren, wo es nach HÄUSLER (1981) keinen wesentlichen Aktivitätsverlust erleidet, und unmittelbar nach dem Auftauen verwendet.

3.1.3. Angewandtes Meßverfahren

Wir ermittelten die Aktivität der vermuteten "DFP-ase" durch die Feststellung der Serumcholinesterase-Restaktivität nach Inkubation mit DFP, ausgedrückt in Prozent der individuellen Cholinesterase-Ausgangsaktivität, ähnlich dem von GELDMACHER - v. MALLINCKRODT et al (1969) für die Bestimmung der Paraoxonase-Aktivität mittels der Anti-ChE-Technik angewandten Verfahren.

Die Serumcholinesterase-Restaktivität wurde mit der Warburg-Apparatur Typ V 85 der Firma Braun, Melsungen, bestimmt. Angewandt wurde die manometrische Methode von AMMON (1934) in der Modifikation von FRIEDBERG und SAKAI (1958), jedoch bei einem pH-Wert von 7,2.

3.1.4. Herstellung der geeigneten DFP-Giftlösung

Bei der Bearbeitung der DFP-Giftlösung hielten wir uns streng an die von GREINER (1980) aufgestellten Arbeitsvorschriften:

- Der DFP-Ansatz wurde in einem anderen Raum mit Abzugsanlage (nicht im Meßraum mit der Warburg-Apparatur) hergestellt, um Fehlerquellen, bedingt durch die große Flüchtigkeit des DFP, auszuschalten.
- Der Giftansatz wurde in mit Glasschliffen fest verschlossenen Erlmeyerkolben nicht länger als 10 Stunden bei 4° C aufbewahrt.
- Als Antidot stand stets 2%ige NaOH Lösung bereit.

Zur Ermittlung der geeigneten DFP-Konzentration stellten wir verschiedene Meßreihen mit unterschiedlicher Verdünnung her. Dabei verwendeten wir die Seren von drei Probanden, deren Serumcholinesteraseaktivitäts- und Restaktivitätswerte nach Inkubation mit DFP schon bekannt waren.

Dabei ermittelten wir folgende DFP-Ansätze:

Giftlösung I : 1 µl DFP (aus Originalabfüllung) wurde mit einer geeichten Mikropipette in 120 ml ultrareinem Wasser gelöst, wobei ein 250 ml Erlmeyerkolben mit Schliffstopfen als Gefäß diente.

Diese Mischung wurde 10 Minuten kräftig geschüttelt.

Giftlösung II: Aus der Giftlösung I wurden mit einer geeichten Mikropipette 5 µl

in 40 ml einer Verdünnungslösung übergeführt, die aus 10 Teilen einer 0,9%igen NaCl - und 3 Teilen einer 1,26%igen NaHCO_3 - Lösung bestand. Als Gefäß diente ebenfalls ein 250 ml Erlmeyerkolben mit Schliffstopfen.

Es wurde wieder 10 Minuten lang geschüttelt.

Die Konzentration dieser Lösung II lag bei $5,64 \times 10^{-9} \text{ mol/l}$

3.1.5. Versuchsablauf

Auf je 0,15 ml Serum wurde 1,35 ml Verdünnungslösung bzw. 1,35 ml Vergiftungslösung II gegeben. Nach dieser Vergiftung des Serums wurde die Zeituhr auf eine Stunde gestellt (Inkubationszeit). In der nun ablaufenden Stunde wurde in den Reaktionsraum der Warburggefäße 1,5 ml einer 0,546%igen Butyrylcholinjodidlösung und in die Anhangsbirne 0,5 ml des verdünnten (für die Messung der Normalaktivität) bzw. des vergifteten Serums (für die Messung der Restaktivität) einpipettiert.

Für jede untersuchte Person wurden pro Versuchsablauf zwei Normalwerte und zwei Werte nach Vergiftung ermittelt.

Bei jedem Versuchsablauf an der Warburg-Apparatur konnten die Seren von 2 Probanden gleichzeitig untersucht werden. Zur Kontrolle diente jedesmal mein Serum, von dem Serumcholinesteraseausgangs- und Restaktivität nach Vergiftung mit DFP bekannt waren.

Wichen meine Aktivitäten mehr als 10 % vom Mittelwert ab, so wurde der Versuch wiederholt.

Um die Eigenhydrolyse zu kontrollieren liefen jedesmal zwei Leerwerte mit, wobei bei diesen der Reaktionsraum wie vorgenannt auch 1,5 ml Butyrylcholinjodidlösung, die Anhangsbirne jedoch 0,5 ml reine Verdünnungslösung enthielt.

Um Verunreinigung der unvergifteten Verdünnungslösung mit DFP zu vermeiden, wurden zuerst die unvergifteten Lösungen in die Warburggefäße pipettiert und an die Manometer angeschlossen. Erst anschließend wurden die vergifteten Ansätze hergestellt und ebenfalls angeschlossen. Besondere Aufmerksamkeit wurde dabei auf das Abdichten der Manometerhähne gerichtet. Die Gefäße wurden fixiert, in ein Wasserbad von 37° Celsius gehängt und mit einer Frequenz von 100/min gerüttelt. Nach einer Inkubationszeit von 35 Minuten wurden die Kölbchen 20 Minuten lang mit einem Gemisch aus 95 % N₂ und 5 % CO₂ unter Rütteln begast.

Am Ende der Inkubationszeit lag der PH-Wert bei etwa 7,7 (SÜLLMANN 1964).

Fünf Minuten vor Ablauf der Inkubationszeit wurden die Gefäße gekippt (d.h. der Inhalt der Anhangsbirnen wurde in die Reaktionsräume entleert) und drei Minuten lang unverschlossen gerüttelt. Danach wurden die Manometerdifferenzen notiert und das System nach außen hin abgeschlossen. Nach 15 und 30 Minuten wurde der Manometerstand abgelesen, wobei die Schüttelautomatik, die während der 30 Minuten lief, für den kurzen Ablesevorgang ausgeschaltet wurde.

3.1.6. Berechnung der Serumcholinesterase-Restaktivität

Für die Versuchsauswertung waren die 30-Minuten-Manometerwerte entscheidend. Von diesen Werten wurden die vorher ermittelten Manometervordifferenzen abgezogen. Der sich so ergebende Wert wurde mit der jeweiligen Manometerkonstanten multipliziert.

Die Leerwerte wurden genauso behandelt.

Nach SÜLLMANN (1964) ergibt sich die Manometerkonstante nach folgender Formel:

$$K = \frac{V_G \times \frac{273}{T} + V_F \times a}{P_O}$$

Dabei gilt: V_G = Gasraumvolumen

T = Versuchstemperatur

V_F = Flüssigkeitsvolumen

P_O = Normaldruck

a = Absorptionskoeffizient

Aus den zwei Ausgangswerten, den zwei Werten nach Vergiftung und ebenso aus den beiden Leerwerten wurde nun jeweils das arithmetische Mittel gebildet. Dann wurde der gemittelte Leerwert von den beiden Mittelwerten der Fermentmessung abgezogen.

Der so ermittelte Wert des unvergifteten Serums wurde als 100 % (=Normalaktivität der Serumcholinesterase) angenommen. Die Restaktivität wurde in Prozent der Normalaktivität aus dem ermittelten Wert des vergifteten Serums berechnet.

3.2. Versuchsergebnisse

Für die Untersuchung stellten sich 28 Mitglieder einer Großfamilie aus den Räumen Ingolstadt, München und Speyer zur Verfügung.

Die beteiligten Personen erklärten sich mit der Veröffentlichung ihrer Daten einverstanden.

Die folgende Aufstellung zeigt neben den bei der Messung mit der Warburg-Apparatur erhaltenen Werten für die Serumcholinesterase-Normalaktivität und der Restaktivität das Alter der Probanden.

Tabelle 3

Serumcholinesterase-Normalaktivität in $\mu\text{l CO}_2/30 \text{ min}$ und Restaktivität in % der Normalaktivität nach Vergiftung mit DFP

Name	Alter	Ausgangsaktivität (in $\mu\text{l CO}_2/30 \text{ min}$)	Restaktivität in % der Ausgangsaktivität
1) Wallrap Zenta geb. Hausner	75	228,4	31,8
2) Burzler Anni geb. Hausner	66	194,8	29,2
3) Burzler Hans	46	179,4	32,8
4) Burzler Heidi geb. Mensch	36	230,7	36,4
5) Burzler Jutta	14	195,8	25,4
6) Harzheim Liane geb. Burzler	41	248,4	35,5
7) Harzheim Karl	40	180,3	19,5

Name	Alter	Ausgangsaktivität (in $\mu\text{l CO}_2/30 \text{ min}$)	Restaktivität in % der Ausgangsaktivität
8) Harzheim Wolfgang	19	205,2	24,3
9) Harzheim Doris	18	167,2	26,9
10) Harzheim Andreas	12	189,5	17,8
11) Burzler Horst	38	250,1	23,4
12) Kraus Lina geb. Hausner	67	268,3	35,9
13) Kraus Hans	75	198,5	14,8
14) Vogl Lia geb. Kraus	40	130,7	23,5
15) Vogl Walter	39	185,9	31,8
16) Vogl Harald	18	124,3	16,8
17) Vogl Ursula	16	172,4	28,5
18) Vogl Martin	14	159,9	22,4
19) Kraus Werner	38	132,1	14,9
20) Kraus Helga geb. Amberger	38	150,5	24,3
21) Kraus Arthur	14	163,6	25,0
22) Kraus Hans	48	214,7	18,4
23) Kraus Liane geb. Turiczek	47	152,2	21,0
24) Kraus Stephan	14	198,3	28,0
25) Breu Luise geb. Hausner	53	204,6	34,9
26) Breu Karl	53	204,7	21,5
27) Breu Karl	28	210,2	25,1
28) Breu Thomas	19	139,4	22,8

3.3. Bestimmung des Variationskoeffizienten für die Restaktivität des Kontrollserums bei den einzelnen Versuchsabläufen

Wie bereits erwähnt konnten pro Versuchsablauf an der Warburg-Apparatur die Seren von 2 Probanden und das Kontrollserum untersucht werden. Die ermittelten Werte für die Restaktivität des Kontrollserums und deren Zuordnung zu den Nummern der Probandenpaare aus Tabelle 3 sind in Tabelle 4 zusammengestellt.

Tabelle 4

Zuordnung der Werte der Restaktivität in % der Ausgangsaktivität des Kontrollserums zu den einzelnen Probandenpaaren

Probandenpaar	1-2	3-4	5-6	7-8	9-10
Restaktivität des Kontrollserums in % der Normalaktivität	25,9	24,4	25,8	27,1	25,0
Probandenpaar	11-12	13-14	15-16	17-18	19-20
Restaktivität des Kontrollserums in % der Normalaktivität	27,1	24,8	23,0	23,6	26,3
Probandenpaar	21-22	23-24	25-26	28	
Restaktivität des Kontrollserums in % der Normalaktivität	23,2	24,9	25,2	25,7	

Der arithmetische Mittelwert $\bar{X}$ der Werte der Serum-Cholinesterase-Restaktivität-Kontrollseren in % der Normalaktivität beträgt

$$\bar{X} = 25,14$$

Die Standardabweichung berechnet sich nach folgender Formel:

$$S = \sqrt{\frac{\sum (X - \bar{X})^2}{n-1}} \quad \text{mit } S = 1,295$$

und damit der Variationskoeffizient nach

$$V_K = \frac{S \times 100}{\bar{X}} \quad \text{mit } V_K = 5,15 \%$$

Dabei gilt: X = Einzelwert
 $\bar{X}$ = arithmetischer Mittelwert
 n = Anzahl der Einzelwerte
 S = Standardabweichung
 V_K = Variationskoeffizient

3.4. Untersuchungen zum Erbgang der DFP-ase

Die gemessenen Werte der Cholinesterase-Restaktivitäten lagen zwischen 14,8 % und 36,4 % der Ausgangsaktivitäten mit einem Mittelwert $\bar{X} = 25,45$.

Zur übersichtlichen Darstellung der Verwandtschaftsbeziehungen wurde ein Stammbaum angefertigt. Die Nummern links oberhalb der Personensymbole entsprechen denen der Tabelle 3. Die kleineren nicht gefüllten Kreise weisen auf verstorbene Personen hin, mit deren Seren keine Messung durchgeführt wurde. Um die Restaktivität der Serumcholinesterase zu veranschaulichen wurde sie in die dunklen Personensymbole hell eingezeichnet. Dabei entsprechen 360 Grad einer Serumcholinesteraserestaktivität von 100 Prozent.

Zur Diskussion der verschiedenen "DFP-ase"-Typen in den Abbildungen 5, 6, 7, 8 wurden willkürlich folgende Bezeichnungen gewählt (siehe Tabelle 5):

Tabelle 5

Bezeichnung für zwei angenommene "DFP-ase"-Typen

Serumcholinesterase- Restaktivität (Anti-ChE-Technik)	Serum- DFP-ase- Aktivität	"DFP-ase"-Typ
12 % - 24 %	niedrig	n
24 % - 40 %	hoch	H

Die gemessenen Werte für die Restaktivität wurden nach Tabelle 5 entweder dem "DFP-ase"-Typ "n" oder "H" zugeordnet. Dann wurden die beiden Allele gemäß dem Wert der Restaktivität gewählt und als kleine Kreise unterhalb des Personensymbols eingezeichnet, wobei ein dunkler Kreis auf das merkmalttragende Allel hinweist.

Wenn mehrere Allelekominationen für einen Erbgang möglich waren, wurden die Allelepaare so gewählt, daß sie mit möglichst vielen Allelekonstellationen der folgenden Generationen vereinbar waren.

So wurde z.B. im autosomal dominanten Erbgang für die "DFP-ase H" in Abbildung 5 für den Probanden Kraus Lina (12) das mögliche Allelepaar als heterozygot angenommen, weil es dabei keine Widersprüche im Erbgang zu den Kindern Vogl Lia (14) und Kraus Werner (19) gibt. Wird das Allelepaar jedoch als homozygot angenommen, so tritt ein Widerspruch in der tatsächlichen

Zuordnung der Allelepaare nach den gemessenen Werten der Restaktivität und den Gesetzen des autosomal dominanten Erbganges auf. Die Probanden 14 und 19 müssten dann auch den "DFP-ase"-Typ "H" aufweisen.

Auf diese Weise wurde stets die bestmögliche Allelkombination für den in der jeweiligen Abbildung zu untersuchenden Erbgang einer möglichen "DFP-ase" gefunden.

Die folgenden Abbildungen 5, 6, 7 und 8 zeigen die Genverteilung bei Annahme der verschiedenen Erbgänge und zwar

Abb. 5 den autosomal dominanten Erbgang für die "DFP-ase H"

Abb. 6 den autosomal dominanten Erbgang für die "DFP-ase n"

Abb. 7 den autosomal rezessiven Erbgang für die "DFP-ase H"

Abb. 8 den autosomal rezessiven Erbgang für die "DFP-ase n".

Abbildung 5: Genverteilung bei Annahme eines autosomal dominanten Erbganges für die "DPP-ase H"

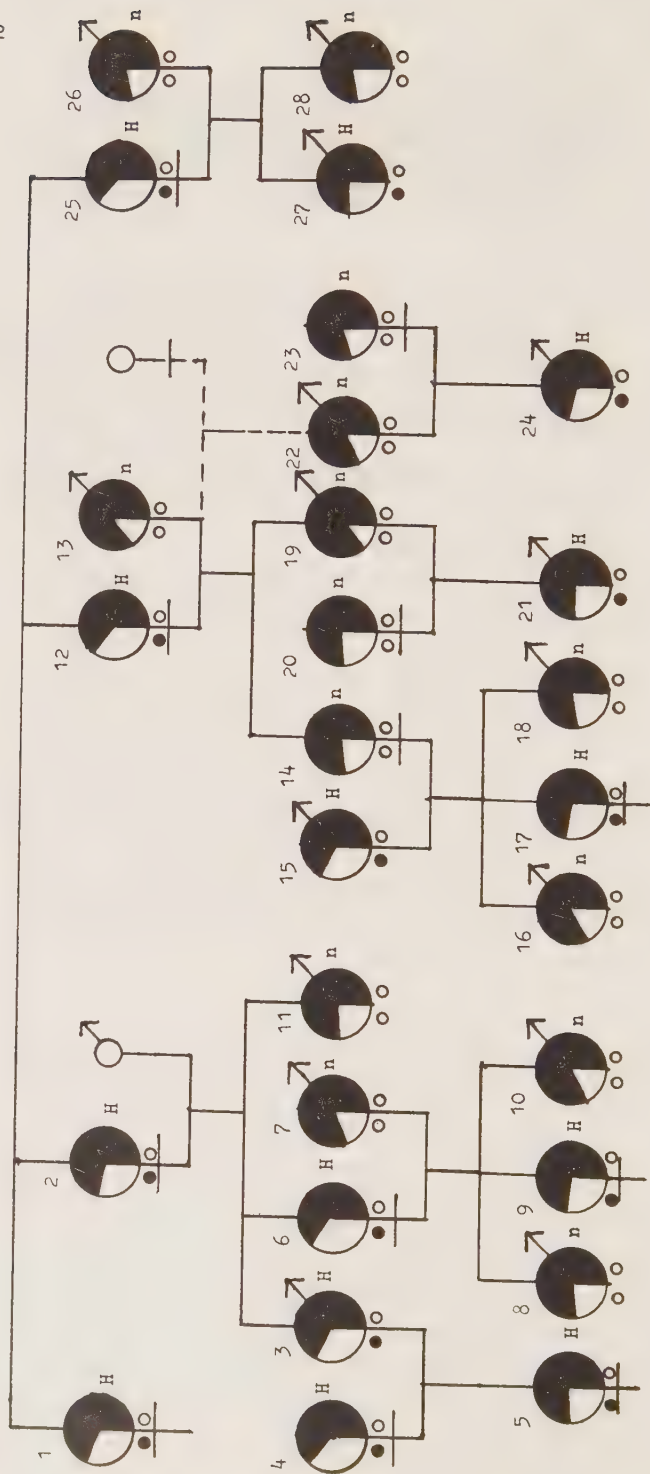
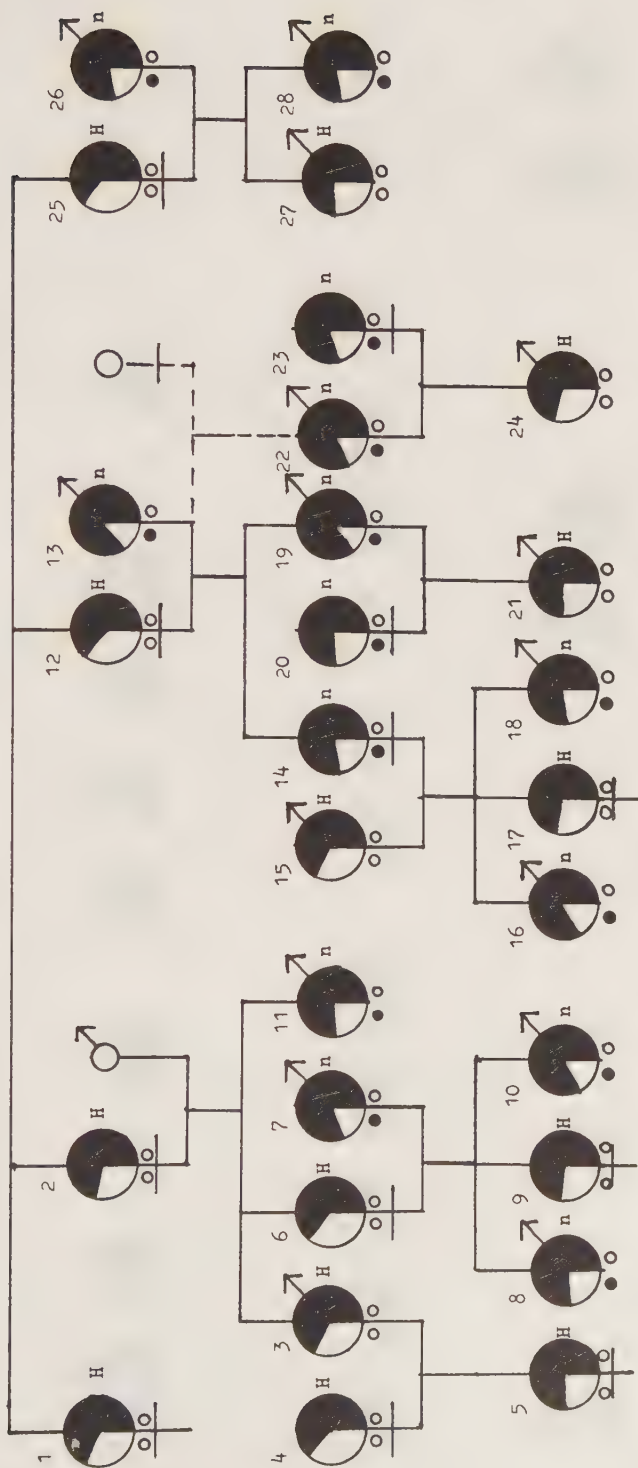


Abbildung 6: Genverteilung bei Annahme eines autosomal dominanten Erbganges für die "DPP-ase n"



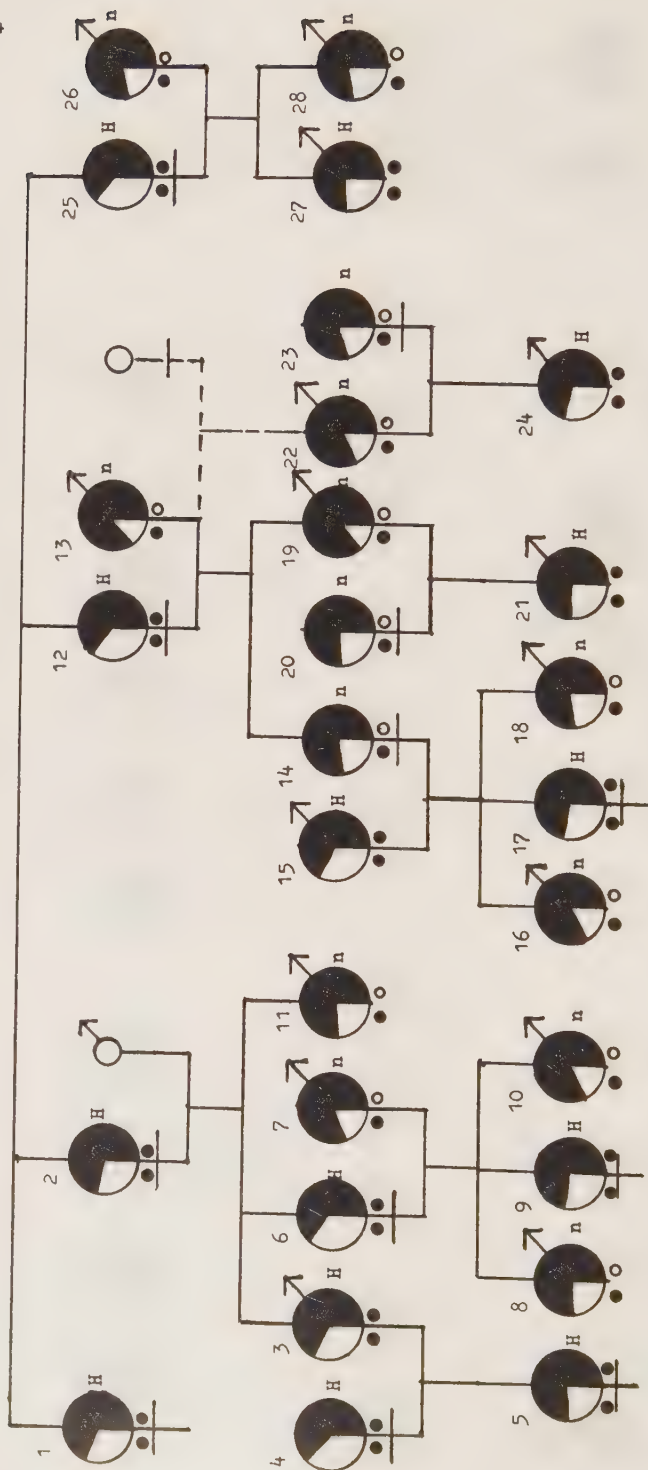
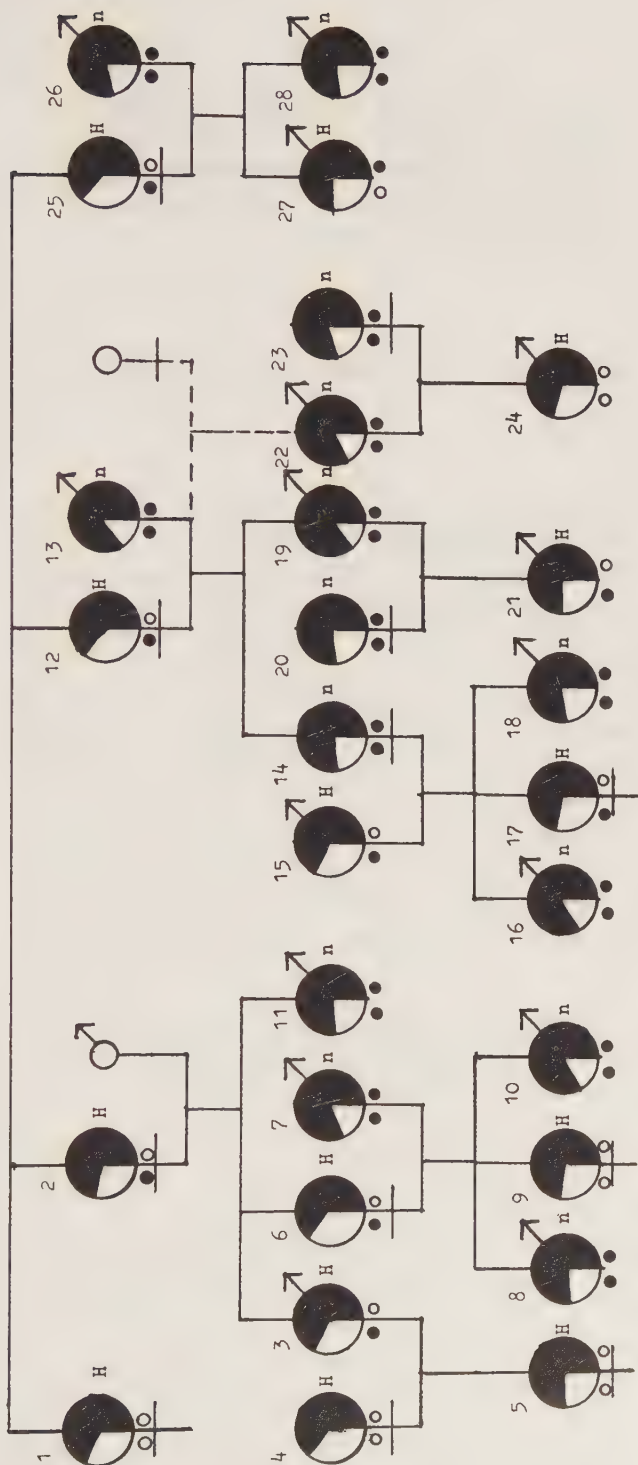


Abbildung 8: Genverteilung bei Annahme eines autosomal rezessiven Erbganges für die "DFP-ase n"



Zur Darstellung eines polymorphen Erbganges nach einem einfachen 2 Allele-System wurden in Anlehnung an die Paraoxonase-Typen nach GELDMACHER v. MALLINCKRODT (1973) folgende "DFP-ase"-Typen definiert:

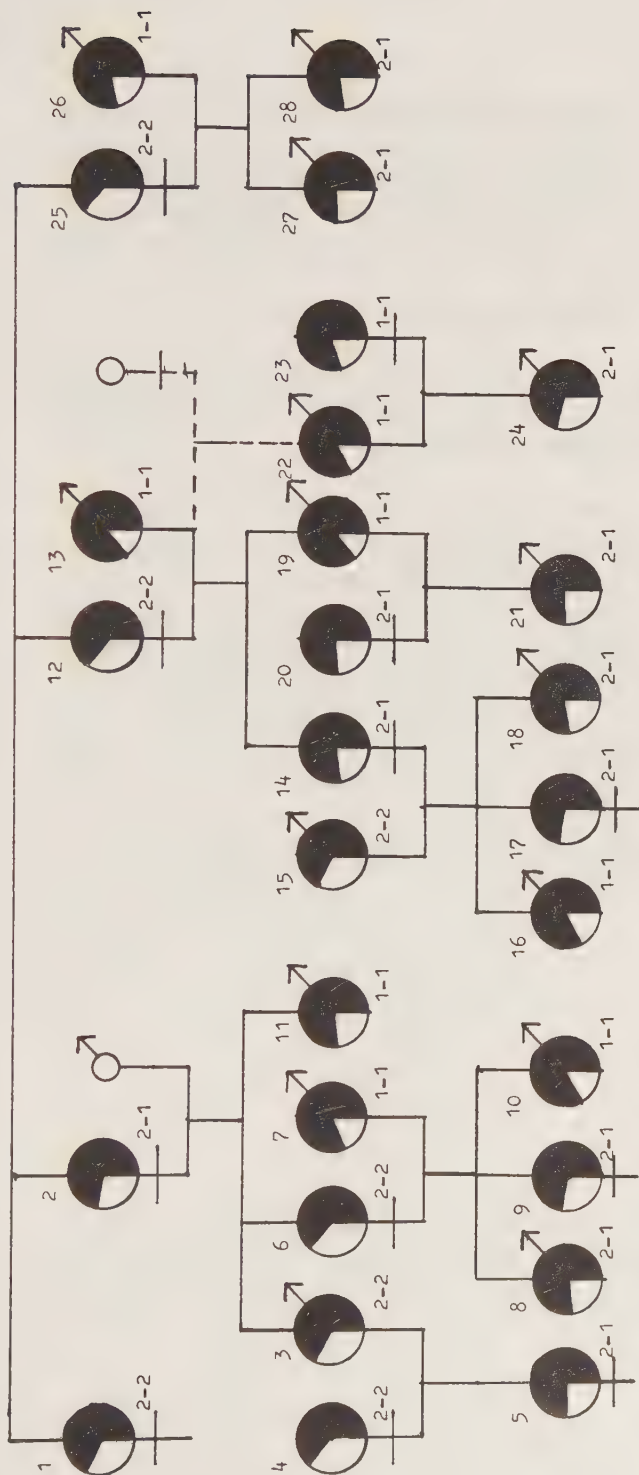
Tabelle 6

Bezeichnung für die verschiedenen "DFP-ase"-Typen

Serumcholinesterase- Restaktivität (Anti-ChE-Technik)	Serum- DFP-ase- Aktivität	"DFP-ase"-Typ
14 % - 22 %	niedrig	1-1
22 % - 30 %	mittel	2-1
30 % - 40 %	hoch	2-2

Die folgende Abbildung 9 zeigt die Genverteilung bei Annahme eines intermediären Erbganges nach einfachem 2 Allele-System.

Abbildung 9: Genverteilung bei Annahme eines intermediären Erbganges nach einfachem 2 Allele-System

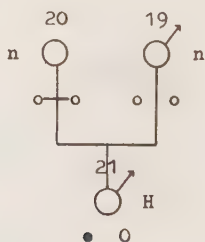


4. Diskussion und Zusammenfassung

In einer Großfamilie mit insgesamt 28 Personen wurde die Serumcholinesterase-Restaktivität nach Inkubation mit DFP bestimmt. Die erhaltenen Werte lagen zwischen 14,8 % und 36,4 % der Ausgangsaktivität mit einem Mittelwert von $\bar{X} = 25,45$.

Mit Hilfe von Stammbäumen wurde in den Abbildungen 5, 6, 7, 8 und 9 eine übersichtliche Darstellung möglicher Erbgänge versucht.

Allerdings muß darauf hingewiesen werden, daß die einzelnen Allelepaare stets so gewählt wurden, daß möglichst wenige Widersprüche in den einzelnen Erbgängen zu verzeichnen sind (siehe Seiten 30,31). So fanden sich bei der Annahme eines autosomal dominanten Vererbungsprinzips für die "DFP-ase H" (siehe Abb. 5) trotzdem zwei Widersprüche im Erbgang. Die Probanden Kraus Werner (19) und seine Frau Helga (20) sind nach der vorgenommenen Einteilung beide homozygot niedrig, während ihr Sohn Arthur (21) einen hohen "DFP-ase"-Typ darstellen würde.



Genauso verhält es sich bei dem Ehepaar Kraus Hans (22), seiner Frau Liane (23) und ihrem Sohn Stephan (24).

Wählt man dagegen die Allelepaare so, daß sie mit möglichst vielen Allelekonstellationen der folgenden Generationen unvereinbar sind, so entstehen 9 Widersprüche bei der Probanden 8, 10, 14, 16, 18, 19, 21, 24 und 28.

Bei Annahme eines autosomal dominanten Erbganges für eine "DFP-ase n" (Abb. 6) entstehen bei günstiger Allele-Konstellation keine Widersprüche, ebenso keine für die angenommenen autosomal rezessiven Erbgänge für die "DFP-ase H" (Abb. 7) und die "DFP-ase n" (Abb. 8).

Ein Anhaltspunkt für einen angenommenen intermediären Erbgang nach einem einfachen 2-Allele-System, wie ihn GELDMACHER - v. MALLINCKRODT und Mitarbeiter (1973 b) für die menschliche Paraoxonase nachwiesen, konnte auch nicht gefunden werden. So treten in dem Modell für ein intermediäres Vererbungsprinzip nach einfachem 2-Allele-System (Abb. 9) 5 Abweichungen auf:

Die Probanden Burzler Hans (3) mit Frau Heidi (4) gehören dem "DFP-ase"-Typ "2-2" an, während ihre Tochter Jutta (5) in die Gruppe "2-1" fällt. Dabei wäre nach folgender Skizze für sie nur der Typ "2-2" möglich:

"2-2"

	2	2
2	2-2	2-2
2	2-2	2-2

"2-2"

Bei Familie Harzheim mit der Mutter Liane (6) in Gruppe "2-2" und Vater Karl (7) in Gruppe "1-1" sind folgende Genkombinationen möglich:

			"2-2"	
			2	2
"1-1"	1	2-1	2-1	
	1	2-1	2-1	

Tatsächlich weisen Sohn Wolfgang (8) und Tochter Doris (9) eine mittlere "DFP-ase"-Aktivität und damit den "DFP-ase"-Typ "2-1" auf, während der jüngste Sohn Andreas (10) widersprüchlich dem Typ "1-1" angehören würde.

Genauso verhält es sich bei Familie Kraus Hans (13) und Frau Lina (12) wo der Sohn Werner (19) anstatt der möglichen Kombination "2-1" den Typ "1-1" trägt.

Für die Kinder der Familie Vogl (14, 15) sind folgende Genkombinationen möglich:

			"2-2"	
			2	2
"2-1"	2	2-2	2-2	
	1	2-1	2-1	

Die Kinder Ursula (17) und Martin (18) gehören dem "DFP-ase"-Typ "2-1" an, während Sohn Harald (16) den nicht möglichen Typ "1-1" trägt.

Die Probanden Kraus Hans (22) und Liane (23) weisen eine niedrige Aktivität auf und sind somit Mitglieder des Typs "1-1", während ihr Sohn Stephan (24) eine mittlere Aktivität aufweist und somit dem Typ "2-1" zugeordnet werden muß, obwohl für ihn nur ein Typ "1-1" bei einem intermediären Vererbungsprinzip möglich wäre.

Zusammenfassend ist festzustellen, daß bei den Untersuchungen an 28 Seren einer Großfamilie über die genetische Steuerung einer eventuellen Serum-DFP-ase kein eindeutiger Erbgang der Cholinesterase-Restaktivität nach Inkubation mit DFP festgestellt werden konnte. Zwar traten bei der Diskussion eines autosomal dominanten Erbganges für die "DFP-ase n", eines autosomal rezessiven Erbganges für die "DFP-ase H" und der "DFP-ase n" bei den gewählten Allelekombinationen keine Widersprüche auf, dennoch kann bei der kleinen Anzahl der untersuchten Personen keine eindeutige Aussage getroffen werden.

Unwahrscheinlich ist nach diesen Untersuchungen ein intermediäres Vererbungsprinzip nach einem 2-Allele-Modell, wie es GELDMACHER - v. MALLINCK-RODT und Mitarbeiter (1973) für die Serum-Paraoxonase nachgewiesen haben.

5. Literaturverzeichnis

- Ahnert, A.:

Dissertation Erlangen (in Vorbereitung)

- Aldridge, W.N.:

Serum Esterase. 1. Two types of esterase (a and b) hydrolysing p-nitrophenyl acetate, propionate and butyrate, and a method for their determination. Biochem. J. 53:110 (1953 a)

- Aldridge, W.N.:

Serum Esterase. 2. An enzyme hydrolysing diethyl p-nitrophenyl phosphate (E 600) and its identity with the a-esterase of mammalian sera. Biochem. J. 53:117 (1953 b)

- Bendtzen, K.

Human leukocyte migration inhibitory factor (lif)
1. Effect of synthetic and naturally occurring esterase and protease inhibitors. Scand. J. Immunol. 6:125 (1977)

- Cohen, J.A. and Warringa, M.G.P.J.:

The fate of P³² labelled diisopropylfluorophosphonate in the human body and its use as a labelling agent in the study of turnover of blood and red cells. J. Clin. Invest. 32:459 (1954)

- Dumbach, J.:

Statistische Analyse zur Genetik der menschlichen
Serumparaaxonase (EC 3.1.1.2)
Dissertation Erlangen 1976

- Erdmann, W.D. und Latki, O.:

Vergiftung mit Diisopropylfluorophosphat (DFP)
Arch. Toxicol. 18:151 (1960)

- Forth, W., Henschler, D. und Rummel, W.:

in Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und
Toxikologie: Seite 93 ff;
Bibliographisches Institut, Mannheim (1975)

- Geldmacher v. Mallinckrodt, M. und Lindorf, H.H.:

Unterschiedliche Reaktion menschlicher Serumcholin-
esterasen mit Alkylphosphaten.
Vortrag auf der 48. Tagung der Deutschen Gesellschaft
für Rechtsmedizin in Berlin, 06. - 09.10.1969

- Geldmacher v. Mallinckrodt, M., Rabast, U. und
Lindorf, H.H.:

Unterschiedliche Reaktion menschlicher Serum-Cholin-
esterasen mit E 600.
Arch. Toxikol. 25, 223 (1969)

- Geldmacher v. Mallinckrodt, M., Baumgartner, W.,
Pétényi, M., Burgis, H., Lindorf, H.H. und
Metzner, H.:

Korrelation zwischen der unterschiedlichen Vergift-
barkeit der Serum-Cholinesterase durch E 600 und
der Aktivität des E 600 spaltenden Enzym-Systems
in menschlichen Seren.

Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 353, 217 (1972)

- Geldmacher v. Mallinckrodt, M., Lindorf, H.H.,
Pétényi, M., Flügel, M., Fischer, T. und Hiller, T.:

Genetisch determinierter Polymorphismus der mensch-
lichen Serum-Paraoxonase (E.C. 3.1.1.2)

Humangenetik 17, 331 (1973 b)

- Geldmacher v. Mallinckrodt, M., Pétényi, M.,
Flügel, M., Burgis, H., Dietzel, B., Metzner, H.,
Nirschl, H. und Renner, O.:

Zur Spezifität der menschlichen Serum-Paraoxonase.

Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 354, 337 (1973 a)

- Geldmacher v. Mallinckrodt, M., Hommel, G. und
Dumbach, J.:

On the genetics of the human serum paraoxonase
(E.C. 3.1.1.2)

Hum. Genet. 50:313 (1979)

- Greiner, G.:

Methode zur Bestimmung der Restaktivität der Serum-
Cholinesterase (E.C. 3.1.1.8) im menschlichen Serum
nach Vergiftung mit DFP.

Dissertation Erlangen 1980

- Grob, D., Harvey, A.M., Langworthy, O.R. and Lilienthal, J.L. jr.:

The administration of diisopropylfluorophosphate (DFP) to man III. Effect on the central nervous system with special reference to the electrical activity of the brain.

Bull. Johns Hopkins Hosp. 81:257 (1947 a)

- Grob, D., Lilienthal, J.L. jr., Harvey, A.M. and Jones, B.F.:

The administration of diisopropylfluorophosphate (DFP) to man I. Effect on plasma and erythrocyte cholinesterase, general systemic effects; use in study of hepatic function and erythropoiesis; and some properties of plasma cholinesterase.

Bull. Johns Hopkins Hosp. 81:217 (1947 b)

- Häusler, E.:

Dissertation Erlangen (in Vorbereitung)

- Hansen, D., Schaum, E. und Wassermann, O.:

Organverteilung und Stoffwechsel von Diisopropylfluorophosphat (DFP) beim Meerschweinchen.

Arch. Toxikol. 23:73 (1968 a)

- Hansen, D., Schaum, E. und Wassermann, O.:

Serum level and excretion of diisopropylfluorophosphate (DFP) in cats.

Biochem. Pharmacol. 17:1159 (1968 b)

- Jandorf, B.J. and Mc Namara, P.D.:

Distribution of radiophosphorus in rabbit tissues after injection of phosphoruslabelled diisopropyl-fluorophosphat.

J. Pharmacol & Exper. Therap. 98:77 (1950)

- Johnson, M.K. and Barnes, J.M.:

Age and sensibility of chicks to the delayed neurotoxic effects on some organophosphorus compounds.

Biochem. Pharmac. 19:3045 (1970)

- Kurth, D., Athens, J.W., Cronkite, E.P., Cartwright, G.E. and Wintrobe, M.M.:

Leukokinetic studies v. uptake tritiated diisopropyl-fluorophosphate by leukocytes.

Proc. Sec. Exp. Biol. Med. 107:422 (1961)

- Krisch, K.:

Enzymatische Hydrolyse von Diäthyl-p-Nitrophenylphosphat durch menschliches Serum.

2. Klin. Chem. Klin. Biochem. 6:41 (1968)

- Lange, W. und von Krüger, G.:

Ester der Monofluorphosphorsäure.

Berichte d. dtsh. chem. Gesellschaft 65:1598 (1932)

- Main, A.R. and Dauterman, W.C.:

Determination of the bimolecular rate constant for the reaction between organophosphorus inhibitors and esterase in the presence of substrat.

Nature 198:551 (1963)

- Mazur, A.:

An enzym in animal tissues capable of hydrolyzing the phosphorus-fluorine bond of alkyl fluoro-phosphates.

J. Biol. Chem. 164:271 (1946)

- Mazur, A. and Bodansky, O.:

The mechanism of in vitro and in vivo inhibition of cholinesterase activity by diisopropylfluorophosphate.

J. Biol. Chem. 163:261 (1946)

- Mc Combie, H. and Sounders, B.C.:

Alkylfluorophosphonates, preparation and physiological properties.

Nature 157:287 (1946)

- Moore, W.K.S.:

Two cases of poisoning with diisopropylfluorophosphonate (DFP).

Brit. J. Industr. Med. 13:214 (1956)

- Mounter, L.A.:

Some studies of enzymatic effects of rabbit serum.

J. Biol. Chem. 209:813 (1954)

- Mounter, L.A.:

Identy of diisopropylfluorophosphatase and acylase.

Federation Proc. 15:317 (1956)

- Mounter, L.A. and Dien, L.T.H.:

Liberation of hydrofluoric acid by enzymatic hydrolysis of dialkylfluorophosphates.

Proc. Soc. Exp. Biol. 87:40 (1954)

- Müller, P.U.:

Untersuchungen über die Genetik der unterschiedlichen Vergiftbarkeit menschlicher Serumcholinesterase mit E 600.

Dissertation Erlangen 1975

- Naess, K.:

The specificity of diisopropylfluorophosphate (DFP).

Acta pharmacol. et toxicol. 12:154 (1956)

- Neurath, A.R.:

A component splitting diisopropylfluorophosphate in sendai and newcastle disease virus preparations; its possible identity with haemolysin.

Acta virol. 9:25 (1965)

- Nowotny, P., Preußner, S., Konrad, H. und Kiencke, H.:

Granulozytenkinetik mit radioaktivem Diisopropylfluorophosphat (DF³²P).

Folia haematol. 94:326 (1970)

- Quilliam, J.P.:

Diisopropylfluorophosphate (DFP) its pharmacology and its therapeutic uses in glaucoma and myasthenia gravis.

Post-Grad. M.J. 23:280 (1947)

- Rump, S., Galecka, E., Grudzinska, E., Jiozuk, I. and Rabsztyn, T.:

New trends in experimental therapie of organophosphate intoxications.

Environ. Qual. Saf. 3:609 (1975)

- Russel, W.R., Vasquez, B.J., Overstreet, D.H. and Dalgish, F.W.:

Consummatory behavior during tolerance to and with drawal from chronic depression of cholinesterase activity.

Physiol. Behav. 7:523 (1971)

- Schlaak, M.:

Schwere Vergiftung mit Diisopropylfluorophosphat.

Arch. Toxikol. 22:155

- Schrader, G.:

Chlorothion: Ein neues, wenig giftiges Insektizid aus der Reihe der Thiophosphorsäureester.

Angewandte Chemie 66:265 (1954)

- Sedan, J.:

Intoxications par le DFP, observées en Series
dans un Laboratoire de Biochemie.

Ann. ocul 185:903 (1952)

- Skrinjaric-Spoljar, M. and Reiner, E.:

Hydrolysis of diethyl-p-nitrophenylphosphate and
ethyl-p-nitrophenylphosphate by human sera.

Biochem. Biophys. Acta 165:289 (1968)

- Verbeke, R.:

Sur la Pharmacologie du Diisopropylfluorophosphate
(DFP).

Arch. int. pharmacodyn 75:415 (1948)

- Verbeke, R.:

Nouvelles Contributions à la Pharmacologie du
Diisopropylfluorophosphate (DFP).

Arch. int. pharmacodyn 79:1 (1949)

Herrn Professor Dr. H.-B. Wuermeling danke ich für die Arbeitsmöglichkeit in seinem Institut und die freundliche Übernahme des Korreferates.

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Professor Dr. Dr. Geldmacher - v. Mallinckrodt für die Überlassung des Themas, für ihre große Hilfsbereitschaft bei allen Problemen und die jederzeit freundlich erteilten wertvollen Ratschläge.

L E B E N S L A U F

- 10.11.1952 geboren als Sohn des Bundesbahnbeamten
Karl Breu und seiner Frau Luise, geborene
Hausner, Hausfrau, in Ingolstadt
- Sept. 1959 Eintritt in die Volksschule St. Anton in
Ingolstadt
- 1960 Übertritt in die Volksschule St. Augustin
in Ingolstadt
- Sept. 1963 Nach vier Klassen Übertritt in das Christoph-
Scheiner-Gymnasium Ingolstadt
- 08.06.1973 Zeugnis der Reife
- Juni 1973 - Ableistung des Zivildienstes am Kreiskranken-
Nov. 1974 haus Kösching
- Nov. 1974 Studium der Chemie an der Universität Regensburg
- Mai 1975 Beginn des Medizinstudiums an der Friedrich-
Alexander-Universität Erlangen
- 25.03.1977 Ärztliche Vorprüfung
- 12.08.1977 Heirat mit Frau Ute, geborene Fetter
- 31.03.1978 Erster Teil der ärztlichen Prüfung
- 14.03.1980 Zweiter Teil der ärztlichen Prüfung
- 14.04.1980 - Praktisches Jahr mit Ausbildung am Lehrkranken-
13.03.1981 haus Fürth, an der Universitäts-Nervenklinik
und an der Medizinischen Klinik der Universität
Erlangen-Nürnberg
- 12.05.1981 Dritter Teil der ärztlichen Prüfung
- 15.05.1981 Approbation als Arzt
- 09.06.1981 Beginn der ärztlichen Tätigkeit als Assistenz-
arzt im Kreiskrankenhaus Kösching

